PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet
H-7624 Pécs, Szigeti út 12.
Tel.: 72 / 536 – 279; Fax: 72 / 536 – 277
E-mail: ferenc.gallyas@aok.pte.hu

Bírálat
Dr. Ambrus Attila
A lipoamid-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex molekuláris patológiája
című doktori disszertációjára.

Az MTA doktori értekezés hivatalos bírálója a biokémia és molekuláris biológia területén viszonylag könnyű helyzetben van a mű tudományos újdonsága, értéke, illetve a bemutatott eredmények hitelessége megítélésének kérdésében, mivel ezt a tudományos közvélemény objektív mérhető módon megteszi helyette. Dr Ambrus Attila MTA doktori értekezése 7 zsűrizett közleményen alapul, amelyek átlag impakt faktora kifejezetten magas; 5,66. Az sem lehet kérdéses, hogy a közölt eredmények mennyiben tekinthetőek a jelölt sajátjaként, hiszen a közlemények közül négyben első, háromban utolsó szerző. Az eredmények tudományos fontosságának megítéléséhez pedig figyelembe kell venni a szorosabb értelemben vett tudományterületet. Dr Ambrus Attila tudományos tevékenységét egy rendkívül nehéz és munkaintenzív területen, a fehérjék szerkezetvizsgálata, illetve a szerkezet-hatás összefüggésének meghatározása területén végezte, illetve végzi.

Noha nem ez volt a célja, a jelölt igen jól érzékelteti a terület nehézségeit és kihívásait, tekintve, hogy számos összetett és igen magas technikai tudást feltételező technikát (rekombináns fehérje előállítás, tisztítás, kristályosítás, távoli-UV cirkuláris dikroizmus spektroszkópia, magrezonancia spektroszkópia, hidrogén-deutérium-csere tömegspektrometria, kémiai keresztkötéssel kapcsolt tömegspektrometria, röntgen diffrakciós szerkezetvizsgálat, krio-elektromikronszkópia, molekuláris dinamika szimuláció, molekulamodellezés) használt, jórészt azért mert önmagában egyik technika sem vezetett kielégítő eredményre. A terület másik sajátossága, hogy a rengeteg munka árán nyert, és a többnyire igen megbízható eredmény publikálása csak kivételes esetben hozza a befektetett munkával arányos idézettséget. Ebben a tekintetben, a Dr Ambrus Attila életművére kapott 2262 független hivatkozás kifejezetten impozánsnak mondható.

Az értekezés a mostanában divatossá vált tézisek formájában íródott. Témáját tekintve, a mind fiziológiás, mind patofiziológiás szempontból rendkívül fontos citrátköri enzim, az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex, illetve az enzim harmadik fajta alegységét képező lipoamid-dehidrogenáz szerkezeti sajátosságait és szerkezet-enzimhatás összefüggéseit vizsgálja különböző, a humán patofiziológiában előforduló mutánsok felhasználásával. Az értekezés terjedelme 68 oldal irodalomjegyzékkel és köszönetnyilvánítással együtt. A bíráló megkapta továbbá az értekezés alapjául szolgáló 7 közlemény másolatát is. Terjedelmében és felépítésében megítélésem szerint az értekezés kielégíti az MTA doktori értekezésekkel szemben támasztott formai követelményeket.

A jelölt igen jó érzékkel megtalálta az egyensúlyt a tézisekre jellemző tömör szerkesztésmód, és azon elvárás között, hogy a doktori értekezés a jelölt tudományos teljesítményének megítélésére alkalmas önálló tudományos mű legyen. Az értekezés stílusa világos, logikus, és a jól megválasztott ábrák segítségével még a nem szakember olvasó számára is jól követhető.

A bevezetés arányaiban és mélységében is megfelelő. A témában kevésbé járatos olvasó számára is érthetően megvilágítja a téma tudományos hátterét, megalapozza a célkitűzéseket, illetve fogódzót ad az eredmények és azok jelentőségének megértéséhez. Ugyancsak nagyon jónak tartom a célkitűzéseket, bár az utolsó célkitűzéssel kapcsolatban kritikát fogalmaztam meg (lásd kérdések 1). Az „Alkalmazott módszerek” fejezet szintén kifejezetten jól sikerült a módszerek tömör, ámde érthető ismertetése. A fejezet alapján megállapítható, hogy az alkalmazott módszerek adekvátak, többnyire a tudományterület csúcstechnológiáját képviselik, valamint tanúbizonyságot adnak a szerző széles metodikai jártasságáról.

Az eredmények jól dokumentáltak; 29 számozott ábra található az értekezésben. Kár, hogy többségében ezeken az eredeti angol szöveg szerepel. Ugyanakkor, az ábraaláírások minden esetben elég informatívak. A hivatkozások adekvátak, az ismertetett kísérletek minden esetben logikusan vezetnek a következtetésekhez. Az értekezés Dr Ambrus Attila nevéhez köthető új tudományos eredményeinek az alábbiakat tartom:

1/ Az exogén liponsav acidózisban gátolja az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex és a lipoamid dehidrogenáz reverz katalitikus irányú reaktív oxigén spéciesz képzését.

2/ Rekombináns technológiával előállították mind a 14 betegséget okozó humán lipoamid-dehidrogenáz mutánst, amelyek mindegyikét jellemezték forward és reverz irányú katalitikus, illetve reverz katalitikus irányú reaktív oxigén spéciesz-képző aktivitás szempontjából. Azonosítottak négy mutációt, amelyek szignifikánsan fokozták az utóbbi aktivitást, ezáltal hozzájárulhattak a betegség molekuláris patomechanizmusához.

3/ A komplex E1 komponensének (alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz), illetve az E1-E2 (dihidrolipoil szukciniltranszferáz) alkomplexének forward katalitikus irányú reaktív oxigén spéciesz-képző aktivitása összemérhető a teljes komplex ilyen típusú aktivitásával. Ennek a jelenségnek E2-, illetve E3-elégtelenségben patológiás relevanciája lehet.

4/ Elsőként határozták meg a humán dihidrolipoil szukciniltranszferáz (hKGDH-E2) szerkezetét, amelyet részletesen elemeztek.

5/ Meghatározták a humán alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex alegység összetételét, amely 24:24:12-nek adódott.

6/ Elsőként tettek javaslatot a humán alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex szerkezeti topológiájára vonatkozóan.

7/ Tíz betegséget okozó humán lipoamid-dehidrogenáz mutánsra vonatkozóan meghatározták a peptid-szintű molekulaszerkezeti/dinamikai változásokat oldatban 25 °C-on, valamint javaslatot tettek a molekuláris patomechanizmusra vonatkozóan.

8/ Meghatározták hét betegséget okozó humán lipoamid-dehidrogenáz mutáns nagy-felbontású kristályszerkezetét, valamint javaslatot tettek a molekuláris patomechanizmusra vonatkozóan.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim:

1/ A jelölt a disszertációjában többször is megállapította, hogy a kísérletes rendszerek fiziológiás körülményekhez történő közelítése esetében a mért paraméterek jobban magyarázták a mutációk következtében a betegekben kialakult tüneteket, mint az izolált rekombináns alegységeken végzett mérések esetén. Mindezek alapján nem volt túlzott elvárás a Célkitűzések 5. pontja, nevezetesen a fehérjeszerkezeti és molekulamodellezési adatok alapján történő gyógyszerjelölt molekulák tervezése?

2/ Az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz komplex javasolt szerkezete alapján vannek-e olyan adatok, amelyek esetleges enzim-enzim interakcióra, illetve a citrátköri enzimek magasabb szerveződésére utalnának?

3/ A Bradford-módszer viszonylag szűk tartományban lineáris. Nem lett volna előnyösebb a fehérjekoncentrációk meghatározására a módosított Bradford (E595/E450) használata?

4/ A lipoamid dehidrogenáz variánsok molekuláris dinamikai szimulációjára használt X-PLOR-NIH és a dihidrolipoil szukciniltranszferáz szerkezetének megállapítására használt molekulamodellezési szoftverek mennyiben tudták figyelembe venni a vizsgált enzimek specifikus sajátságait? Volt arra lehetőség, hogy a szoftvereket a vizsgált enzimekhez hasonló standardokra specifikálják? Az X-PLOR-NIH csak összehasonlításokra alkalmazható vagy konkrét fehérjeszerkezeti javaslatokat ad?

Összegezve, Dr Ambrus Attila jelentős tudományos eredményekkel járult a terület tudásanyagának bővítéséhez. MTA doktori értekezése mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel az elvárásoknak, ezért javaslom értekezésének nyilvános vitára bocsátását, és sikeres védés esetén számára az MTA Doktora cím megadását.

Pécs, 2022. 02. 17.

ifj. Dr. Gallyas Ferenc
egyetemi tanár